

液相色谱 – 串联质谱法测定 Beagle 犬血浆中黄体酮浓度及其药动学^{*}古丽努尔·塔西铁木尔, 赵文惠, 高晓黎^{**}

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的: 建立液相色谱 – 串联质谱法(LC – MS/MS) 测定 Beagle 犬血浆中黄体酮含量。**方法:** 取 Beagle 犬血浆样品, 加入适量内标(炔诺酮), 用液相萃取技术, 经超高效液相色谱分离。色谱柱: Agilent ZORBAX – SB C₁₈ 分析柱(150 mm × 2. 1 mm, 5 μm); 保护柱: Agilent C₁₈ 分析柱(10 mm × 2. 1 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 – 0. 1% 甲酸水溶液(90: 10); 流速 0. 2 mL · min⁻¹。采用 APCI 离子化 – 串联质谱多离子反应监测(MRM) 模式进行检测, 放电电流(NC) = 3. 00, 雾化气(GS1) = 30. 00, 辅助气(GS2) = 50. 00, 气帘气(CUR) = 30. 00, 温度(TEM) = 350. 00, 碰撞活化裂解(CAD) = Medium(以上单位均为仪器单位), 离子选择通道分别为 m/z 315. 0/109. 2(黄体酮) 和 m/z 299. 0/109. 1(内标)。结果: 黄体酮血浆浓度在 0. 5 ~ 25 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r = 0. 9991$), 日内和日间精密度的 RSD 均小于 7. 5%, 方法回收率为 91. 8% ~ 100. 7%, 提取回收率为 84. 2% ~ 91. 5%, 最低定量限为 0. 5 ng · mL⁻¹, 最低检测限为 0. 2 ng · mL⁻¹。结论: 该方法专属性强, 灵敏度高, 准确性好, 适用于 Beagle 犬血浆中黄体酮含量的测定, 可应用于黄体酮制剂生物等效性研究。

关键词: 黄体酮; 液相色谱 – 串联质谱法; 血药浓度; 炔诺酮; 血浆样品; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 – 1793(2011) 11 – 2040 – 06

LC – MS/MS determination of progesterone in Beagle plasma and its pharmacokinetics^{*}Gulnur Taxtumur, ZHAO Wen – hui, GAO Xiao – li^{**}

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract Objective: To establish a liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) method for the quantitative of progesterone in Beagle dog's plasma. **Methods:** The Beagle plasma sample, and additional internal standard (norethisterone), were treated with liquid – liquid extraction and separated by UPLC. Column: Agilent ZORBAX – SB C₁₈ (150 mm × 2. 1 mm, 5 μm); guard column: Agilent C₁₈ (10 mm × 2. 1 mm, 5 μm); mobile phase: methanol – 0. 1 % formic acid solution (90: 10); flow rate: 0. 2 mL · min⁻¹. Sample was analyzed by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) applying MRM scan type. NC = 3. 00, GS1 = 30. 00, GS2 = 50. 00, CUR = 30. 00, TEM = 350. 00, CAD = Medium. The selected ions for mass monitoring were m/z 315. 0/109. 2 (progesterone) and m/z 299. 0/109. 1 (norethisterone, internal standard). **Results:** The linear range of progesterone was 0. 5 – 25 ng · mL⁻¹. Within day RSD and day to day RSD were both less than 7. 5%. The method recovery and extraction recovery of the assay were 91. 8% – 100. 7% and 84. 2% – 91. 5% respectively. The detection limit was 0. 2 ng · mL⁻¹. **Conclusion:** The established method of LC – MS/MS determining the concentration of progesterone in plasma has the characteristic of strong specificity, high sensitivity and good accuracy, suitable for quantitation of progesterone in Beagle plasma and can be applied to bioequivalence studies of progesterone preparation.

Key words: progesterone; LC – MS/MS; APCI; plasma drug concentration; acthisteron blood plasma sample; pharmacokinetics

黄体酮(progesterone) 是由卵巢黄体分泌的 1 种 天然孕激素, 与雌激素一起参与下丘脑 – 垂体卵巢轴

* 新疆乌鲁木齐市高新区创新基金(CX10208W)

** 通讯作者 Tel: 13609905058; E – mail: xli_g@sina. com

的调节,精细地介入排卵性月经周期,能促进子宫黏膜的增殖分泌,完成受孕准备,有保胎作用,同时对成年女性因黄体分泌功能不良引起之疾病有一定疗效。常用于月经失调、先兆流产、习惯流产、经前期综合征、功能失调性子宫出血等疾病治疗^[1~4]。另外,牛芝兰等在临床实践中发现黄体酮用于慢性前列腺炎大和慢性宫颈炎,慢性附件炎也有一定疗效^[5]。近年来的深入研究还发现,黄体酮不单只是用于治疗妇产科的疾病,临床上还可用于治疗顽固性腹水、睡眠呼吸暂停综合征、慢性呼吸衰竭、输尿管结石、肾绞痛以及绝经后妇女的骨质疏松症等疾病^[6~11]。

由于黄体酮在实验动物体内含量很低,均在 ng 级,采用 HPLC 法很难检测其体内浓度,生物样品中黄体酮含量的测定方法以放射免疫法为主,测定时,黄体酮与其代谢物及多种结构相似的甾体激素有交叉免疫反应^[12]。液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)在选择性、灵敏度、相对分子质量测定和提供结构信息等方面具有明显的优势,能够同时获得可靠的定性定量结果,因而已经被广泛应用于药物在生物体内的吸收、分布和代谢研究(包括代谢物的结构确定及定量)^[13]。应用 HPLC-MS 联用技术可获得复杂混合物中单一成分的质谱图,大大有利于药物、药物代谢物和内源性化合物的分离与鉴定;药物发生代谢转化后,一般仅在母体药物的结构基础上进行部分结构修饰,因此代谢物与母体药物常有相似的质谱特征离子,据此可对代谢物进行识别,并结合其他碎片特征,对其结构作出合理推断^[14]。体内中的黄体酮的测定受 5α -孕烷-3,20-二酮、11-脱氧皮质酮或 17α -羟孕酮(17-OHP)等不同甾体的影响而发生交叉反应。为了克服这些问题,可以利用 HPLC-MS/MS 方法分离这些甾体,对体内的黄体酮药物含量进行评价^[15]。

本文建立的 UPLC-Q-TRAP 检测方法具有灵敏度高,专属性强,准确性好的特点。为进一步研究比较黄体酮肌肉注射,口服给药及经皮给药等几种剂型在体内药代动力学参数和进行黄体酮体内吸收评价奠定基础。

1 仪器、试剂及动物

Q-TRAP 4000 液相色谱-质谱-质谱联用仪(AB Applied Biosystems),含自动进样器、柱温箱、大气压化学离子化接口(APCI);Agilent 1200 G1311A 超高效液相色谱仪;HSC-12A 氮吹仪(北京赛多利斯仪器厂);SK-1 型快速混匀器(金蝉市医疗仪器厂);TGL-16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

黄体酮对照品(中国药品生物制品检定所);内标物炔诺酮(中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。黄体酮胶囊(商品名琪宁,国药准字 H20031099,标示量 100 mg,批号 20080424,浙江爱生药业有限公司)。

Beagle 犬,4 只,雌性,体重(10 ± 2) kg,由新疆医科大学第一附属医院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(新 2018-0001)。试验前 2 周摘除两侧卵巢。

2 色谱条件及质谱参数

色谱柱:Agilent ZORBAX-SB C₁₈ 分析柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μ m);保护柱:Agilent C₁₈ 分析柱(10 mm × 2.1 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.1% 甲酸水溶液(90:10);流速 0.2 mL · min⁻¹;进样体积为 10 μ L,室温操作。

离子源为 APCI 源,放电电流(NC) = 3.00,雾化气(GS1) = 30.00,辅助气(GS2) = 50.00,气帘气(CUR) = 30.00,温度(TEM) = 350.00,碰撞活化裂解(CAD) = Medium(以上单位均为仪器单位),正离子方式检测,扫描方式为多离子反应监测模式(MRM),用于监测的离子为 m/z 315.0/109.2(黄体酮), m/z 299.0/109.1(炔诺酮,内标)。黄体酮和炔诺酮的二级质谱图见图 1。

3 储备液的配制

3.1 黄体酮对照品溶液 精密称取黄体酮对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的储备液。将黄体酮储备液用甲醇稀释,配制浓度为 2.5, 5, 10, 25, 50, 125 ng · mL⁻¹ 的黄体酮对照品溶液,备用。

3.2 内标储备液 精密称取炔诺酮对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的储备液,并用甲醇稀释,配制浓度为 500 ng · mL⁻¹ 的炔诺酮对照品溶液,备用。

4 血浆样品前处理与测定

取血浆 500 μ L,加入内标溶液(500 ng · mL⁻¹) 10 μ L,乙醚 1.0 mL,涡旋混合提取 3 min,离心(4500 r · min⁻¹, 10 min),吸取上清液 800 μ L,再在残留液中加入乙醚 1.0 mL,涡旋混合提取 3 min,离心(4500 r · min⁻¹, 10 min),吸取上清液 700 μ L,合并 2 次得到的上清液转移至 1.5 mL 离心管中, N₂ 流挥干,残渣加入甲醇 200 μ L,涡旋混合 3 min 使其溶解, 10000 r · min⁻¹ 离心 5 min,吸取上清液,微孔滤膜过滤,精密吸取滤液 10 μ L 进样,按“2”项下条件测定。

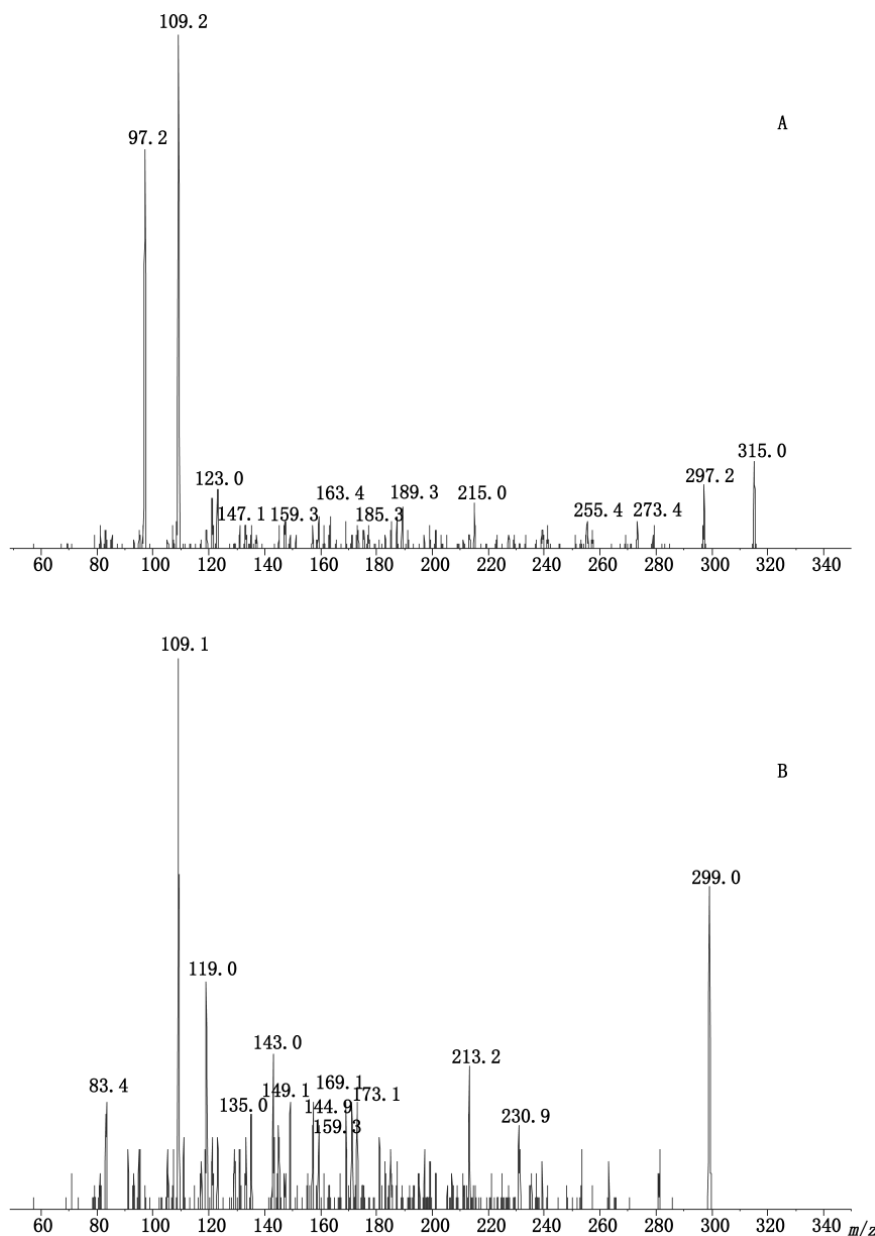


图1 黄体酮(A)与炔诺酮(B,内标)二级质谱图

Fig 1 MS/MS spectra of progesterone(A) and norethisterone(B, internal standard)

5 方法学考察

5.1 专属性试验 取黄体酮对照溶液 100 μL , N_2 流挥干, 加至 Beagle 犬空白血浆 500 μL 及内标溶液 10 μL 中, 即得含有内标物及黄体酮的标准血浆。按“4”项下方法处理并测定, 考察内源性物质及内标物与黄体酮的分离专属性。在选定的测定条件下, 内源性成分无干扰, 内标物与待测成分保留时间分别为 4.2 min 和 5.3 min, 由于两者提取的离子通道不同, 可较好地分离检测。空白血浆、空白血浆加对照品及内标、口服给药样品色谱图见图 2。

5.2 线性关系考察 取黄体酮对照品溶液 100

μL , N_2 流挥干, 加入精密量取的犬空白血浆 500 μL , 制备内标浓度为 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 黄体酮浓度分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准血浆, 按“4”项下方法处理, 并测定和分析, 记录峰面积比 A_s/A_i , 以 A_s/A_i 对浓度 C 进行线性回归, 计算血浆标准曲线。血浆中黄体酮浓度在 0.5 ~ 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与峰面积比呈良好线性关系, 标准曲线方程为:

$$A_s/A_i = 0.7621 + 1.029C \quad r = 0.9991$$

以信噪比 $S/N=3$ 计, 黄体酮最低检测浓度以信噪比 $S/N=10$ 计, 为 0.2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。黄体酮最低定量限为 0.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

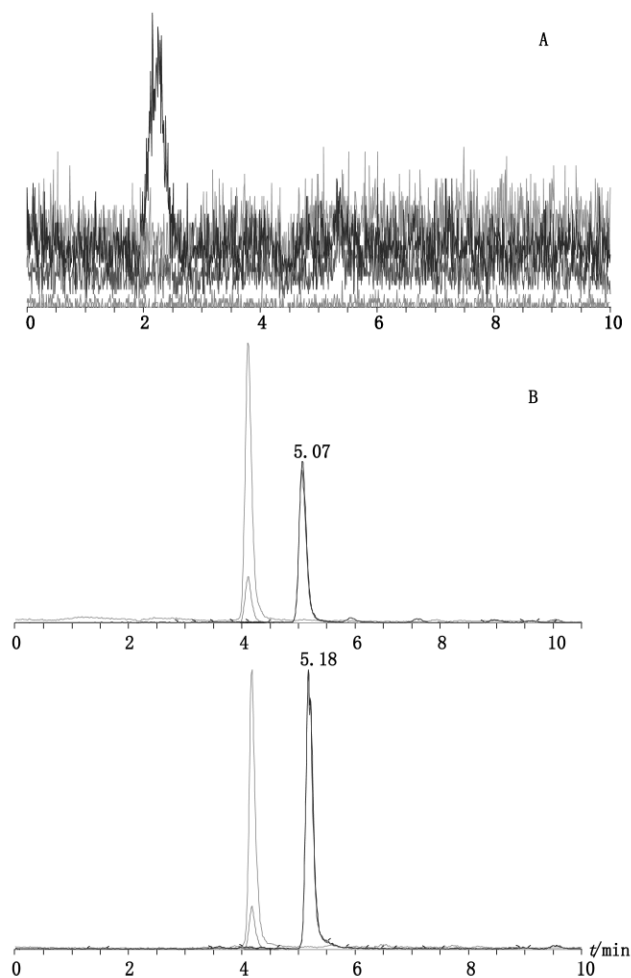


图2 空白血浆样品(A)、黄体酮血浆浓度为 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的模拟生物样品(B)、口服给药样品(C)色谱图

Fig 2 Typical chromatograms of blank plasma(A), blank plasma + progesterone + internal standard(B) and plasma sample after administration(C)

5.3 方法回收率及精密度试验 照“5.2”项下方法制备标准血浆,使其内标物浓度为 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,黄体酮浓度为 $2,5,10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。测定并计算方法回收率及日内,日间精密度。低、中、高浓度的标准血浆3次测定的平均方法回收率($n=5$)为91.8%以上;日内RSD为1.5%~4.3%,日间RSD为2.9%~7.2%。结果见表1。

5.4 提取回收率试验 同上法制备低、中、高3种浓度($2,5,10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的标准血浆,依法测定,计算峰面积比 $A_s/A_{i(1)}$;另外配制相同浓度的对照品溶液,甲醇挥干,复溶液溶解进样,依法测定并计算峰面积比 $A_s/A_{i(2)}$ 。将 $A_s/A_{i(1)}$ 值与相应浓度对照品溶

表1 方法回收率及精密度($n=5$)

Tab 1 Method recovery and within - day, day to day precision

加入量 (added) / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	实测值 (found) / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	方法回收率 (method recovery) /%	日内 (intra - day) RSD/%	日间 (inter - day) RSD/%
2	2 ± 0.03	100.7 ± 11.67	4.3	7.2
5	4.69 ± 0.28	94.70 ± 7.34	2.8	3.8
10	9.18 ± 0.11	91.80 ± 10.41	1.5	2.9

液的 $A_s/A_{i(2)}$ 值进行比较,即得到提取回收率($A_s/A_{i(1)}/A_s/A_{i(2)} \times 100\%$)。低、中、高3种浓度平均提取回收率($n=3$)分别为91.53%,84.24%,89.26%;RSD分别为9.78%,11.62%,10.90%。

5.5 基质效应的考察 取空白血浆,按“血浆样品前处理与测定”项下的方法处理,加入不同浓度的黄体酮对照品溶液,挥干,加入 $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,相当于黄体酮样品浓度($2,5,10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),每个浓度进样5次,分别记录样品或内标峰面积为 A_1 ;另取不同浓度的对照品溶液,挥干,加入 $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,相当于上述样品浓度,每个浓度进样5次,分别记录样品或内标峰面积为 A_2 。结果见表2。

表2 基质效应的考察结果($n=3$)

Tab 2 Ion suppression relative recovery

样品 (sample)	浓度(concentration) / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	A_1 (mean $\pm$ s)	A_2 (mean $\pm$ s)	$A_1/A_2/\%$
黄体酮 (progesterone)	2	11726.5 ± 25.17	13541 ± 2.86	86.6
	5	30166.8 ± 30.93	30158 ± 24.31	100
	10	48135 ± 62.55	50226 ± 16.07	95.8
内标 (internal standard)	10	31375.6 ± 16.50	35451.4 ± 18.07	88.5

5.6 稳定性考察试验 低、中、高3种浓度的标准血浆,分别于配好后立即处理(即冻融0次)(1),进样放置8h(2),反复冻融3次(3)后处理,依法测定。测定结果稳定,表明样品稳定性良好,结果见表3。

表3 稳定性考察试验

Tab3 Storage stability data

处理方式 (process mode)		$2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
		测得响应值(mean observed value), A_s/A_i		
立即处理	(1)	0.1569	1.3789	2.6830
放置8h	(2)	0.1582	1.3834	2.6815
反复冻融	(3)	0.1487	1.3655	2.6698
mean		0.1546	1.3759	2.6781
RSD/%		3.33	2.47	1.07

5.7 质量控制

精密量取空白血浆 500 μL , 按“4”项下方法处理, 配制浓度分别为 2, 5, 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控样品, 均匀分布在未知样品测试顺序中测定, 并用随行标准曲线计算方法回收率, 测得低、中、高 3 种浓度质控样品在 5 个批次的方法回收率平均值在 99.51% ~ 101.1% ($n=3$)。结果见表 4。结果表明, 建立的 LC-MS/MS 方法用于血浆中微量药物的浓度检测, 具有专属性强, 灵敏度高, 准确性好的特点。达到了生物样品分析方法的验证要求。

表 4 黄体酮方法学质量控制试验结果

Tab 4 Quality control samples

	2	5	10
	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	93.6	88.7	92.5
2	104.2	108.1	112.2
3	93.7	97.6	112.2
4	96.0	110.8	86.8
5	110.0	96.4	101.8
平均值 (mean)	99.5	100.3	101.1
RSD/%	7.3%	9.0%	11.3%

6 方法应用

由于黄体酮属抗体内天然存在的 1 种孕激素, 故采用犬卵巢摘除术, 并测定给药零时犬体内的黄体酮浓度以对给药后浓度作以校正, 可有效地避免内源性黄体酮的干扰。

取 Beagle 犬 4 只, 以黄体酮口服琪宁胶囊为试验药品, 按 $5.34 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ 单剂量灌胃给药, 于给药前与给药后 5, 10, 20, 30 min 和 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 h 时间点取血 2 mL, 肝素抗凝, 于 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 取血浆 500 μL , 照“4”项下方法处理和测定, 计算血药浓度, 绘制药时曲线, 将 4 组数据平均结果用药动学软件 (DAS 2.1.1) 进行数据分析, 评价该 UPLC-QTrap 方法用于体内测定的可行性。黄体酮胶囊剂给药后的药时曲线见图 3。按单室模型和二室模型拟合, R^2 分别为 0.5760 和 0.9938。按二室模型 (权重为 $1/C^2$) 处理后的药动学参数见表 5。

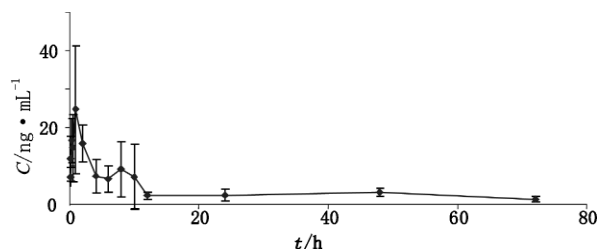


图 3 犬灌胃给药琪宁后血药浓度经时变化曲线 ($n=4$)

Fig 3 The concentration of progesterone determined in plasma of different time after po progesterone in dog

表 5 犬灌胃给药琪宁后药动学参数 ($n=4$)

Tab 5 Pharmacokinetics parameters after intragastric administration

参数 (parameter)	平均值 (mean)
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	5.712
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	32.173
$\text{AUC}_{(0-1)}/\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	149.121
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	242.813
$K_{10}/1/\text{h}$	0.032
$K_{12}/1/\text{h}$	0.078
$K_{21}/1/\text{h}$	0.039
$K_a/1/\text{h}$	2.244
$t_{1/2K_a}/\text{h}$	2.214
T_{lag}/h	2.515
T_{max}/h	1.250
$C_{\text{max}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	23.851

7 讨论

7.1 色谱及质谱条件的选择 现有文献多采用以 70:30 或 80:20 比例的甲醇-水作为流动相。作者在研究中发现 90:10 为比例的甲醇-水作为流动相时色谱分离度更好, 质谱响应值最高。并由于黄体酮属弱碱性药物, 符合正离子模式检测, 因此在水相中加入了 0.1% 甲酸以便于待测物离子化。此外, 有文献报道^[16-20] 采用 ESI 源检测黄体酮, 但作者发现黄体酮为低极性物质, 采用 ESI 源检测响应值会降低, 以采用 APCI 源检测为宜。

7.2 血浆样品前处理方法 涉及血浆中黄体酮液萃取前处理方法的文献多采用乙酸乙酯、环己烷或正己烷等试剂进行萃取, 处理烦琐, 提取回收率不理想。本文采用乙醚提取黄体酮, 简化了样品前处理过程, 提高了提取回收率。

7.3 方法应用评价 本文应用 LC-MS/MS 方法对黄体酮 Beagle 犬口服给药的药时曲线进行了测定, 结果表明, 琪宁胶丸 T_{max} 出现在 (1.250 ± 0.50) h, 这与文献报道的人体口服琪宁胶丸 T_{max} (1.78 ± 0.80) h^[21] 基本相符。通过测定犬血浆药物浓度发现, 黄体酮在胃肠道内较快被吸收进入体循环。可能由于肝肠循环的作用, 口服制剂给药后出现了第 2 个峰, 这与文献报道的人体吸收情况^[21] 吻合。按单室模型和二室模型拟合, R^2 分别为 0.5760 和 0.9938。其中二室模型拟合度更高, 与文献报道^[21] 相吻合。说明建立的 LC-MS/MS 方法用于血浆中微量药物的浓度检测, 具有专属性强, 灵敏度高, 准确性好的特点。达到了生物样品分析方法的验证

要求。

8 小结

综上所述,本文建立的 LC-MS/MS 分析方法有望满足黄体酮各种新剂型体内药代动力学研究的需要。

参考文献

- 1 XIE Tao(谢涛), LIN Chun(林春), SHEN Hong-yun(沈红云). Sensitization dermatitis induced by progesterone in one patient(黄体酮致过敏性皮炎 1 例). *Clin J Med Offic*(临床军医杂志), 2006, 34(6): 173
- 2 Lorraine A, Fitzpatrick MD, Andrew Good MD. Micronized progesterone: clinical indications and comparison with current treatments. *Fertil Steril*, 1999, 72(3): 389
- 3 Mare JNC, Keirse MD, Dphil DPH, et al. Progesterone and preterm: seventy years of “Déjà Vu” or “Still To Be Seen”? *Birth*, 2004, 31(3): 230
- 4 Quan LJ, Zhai ZC. The clinical practical application of the progesterone. *Inter J Fam Plann Book*, 2001, 20(2): 101
- 5 NIU Zhi-lan(牛芝兰). The clinical observation of progesterone for the treatment of prostate and gynecological of certain chronic inflammatory (黄体酮用于治疗前列腺和妇科某些慢性炎症的临床观察). *Chin J Fam Plann*(中国计划生育学杂志), 2002, 10 [Suppl (增刊)]: 100
- 6 HAN Yong-xia(韩咏霞). Progesterone not only for treatment of gynecological diseases (黄体酮不单治疗妇科病). *All Health*(大家健康), 2009, 2: 54
- 7 QIAN Li-Juan(钱丽娟). The application of progesterone in clinical practice(黄体酮在临床实践中的应用). *Inter J Fam Plann Book*(国外医学计划生育册), 2001, 2(2): 101
- 8 PEI De-shan(裴的善), FANG Xin-yu(方信玉). The application of progesterone in the non-maternity diseases(黄体酮在非妇产科疾病中的应用). *Pract J Rural Doct*(实用乡村医生杂志), 1997, 4(2): 43
- 9 GUO Ping-an(郭平安), GUO Hai-fen(郭海奋). Progesterone with cisplatin-fluorouracil in the treatment of esophageal, gastric cardia in 186 patients(黄体酮配合顺铂-氟尿嘧啶方案治疗食管癌, 贲门癌 186 例). *Chin Oncol*(中国癌症杂志), 1996, 6(4): 56
- 10 BAI Da-chun(白大春), HU Wen-qi(胡文启), YAN Yan-chun(杨言春), et al. Progesterone injections on Chengshan points for treatment of renal colic in 478 patients(黄体酮承山穴注射治疗肾绞痛 478 例报告). *Theory Pract Chin Med*(中国医学理论与实践), 2006, 16(8): 963
- 11 Lee JR. Osteoporosis reversal: the role of progesterone. *Inter Clin Nutr Rev*, 1990, 10: 384
- 12 YAN Yong-sheng(鄢永胜). Pharmacokinetics of protein peptide drugs(蛋白多肽类药物的药代动力学). *J Xianning Coll*(咸宁学院学报), 2004, 24(3): 100
- 13 LI Hao-zhi(李好枝). Analysis of in Vivo Drugs (体内药物分析). Beijing(北京): Science and Technology of Chinese Medical Publishing Company(中国医药科技出版社), 2003. 296
- 14 Shimin Z, Sripal RM, Shringi S, et al. Simultaneous quantitation of 17 α -hydroxyprogesterone caproate, 17 α -hydroxyprogesterone and progesterone in human plasma using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 1174
- 15 Kuster M, Azevedo DA, López de Alda MJ, et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ Int*, 2009, 35: 997
- 16 Migaku K, Shin-ichiro F, Nobuyasu I, et al. Development of vial wall sorptive extraction and its application to determination of progesterone in human serum. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7553
- 17 Regal P, Vázquez BI, Franco CM, et al. Quantitative LC-MS/MS method for the sensitive and simultaneous determination of natural hormones in bovine serum. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2457
- 18 XIA Min(夏敏), Reale, Erwann, et al. Simultaneous determination of trenbolone, boldnone and progesterone in animal origin food by HPLC-MS/MS(高效液相色谱串联质谱法测定动物源食品中群勃龙, 勃地酮和黄体酮残留量). *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2007, 26: 264
- 19 Kuster M, Azevedo DA, López de Alda MJ, et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ Int*, 2009, 35: 997
- 20 Maria J, López de Alda, Asunción Gil, et al. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 2002, 127: 1299
- 21 YING Xiao-ying(应晓英), WANG Lei-lei(王蕾蕾), YUAN Hong(袁弘). Determination of progesterone concentration in plasma after oral administration of progesterone-loaded lipid nanoparticles in rats(大鼠口服黄体酮脂质纳米粒的血药浓度测定). *J Zhejiang Univ(Med Sci)*(浙江大学学报 医学版), 2008, 37: 146

(本文于 2011 年 4 月 11 日收到)